

Archivos suplementarios

Anexo 1. Metodología para el procesamiento de la ferritina glucosilada

El suero del paciente se tomó en tubo sin anticoagulante. Después de retraer el coágulo, se llevó a la centrífuga Hettich EBA -20 a 4.000 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 10 minutos y, posteriormente, se congeló a -80 °C.

Se utilizaron los reactivos Sepharosa 4B X 500 mL SIGMA Ref 4B200 y Concanavalina A (Con A) X 250 mg SIGMA Ref C-7275. Dichos reactivos y la muestra del paciente se dejaron a temperatura ambiente dos horas antes de ser utilizados.

Procedimiento:

1. Se utilizaron tubos de 50 ml de tipo Falcon BD (352098 Falcon), a los cuales se les introdujo una cámara con una membrana para filtración hecha a base de lana de vidrio (PANREAC por 100 g) con un peso de 1,5 gramo, quedando con un diámetro aproximado de 2 x 2 cm. Posteriormente, estos tubos se esterilizaron en formaldehído durante seis horas a 55 °C.



2. Se resuspendió la Con A en 10 ml de agua destilada para obtener 25 mg/ml, que debe llevarse a una potencia menor de 64 µg/ml. La Sepharosa utilizada tiene una capacidad de saturación de ≥ 30 mg/ml.
3. Se humedeció la membrana con 3 ml de agua destilada de forma homogénea, teniendo la precaución de añadir a un ml de agua. Después se llevó a la centrífuga Thermo Scientific Sorvall RT3 refrigerada y se realizó un giro hasta llegar a 3.000 r.p.m. para remover el agua utilizada.



4. Se montaron seis tubos debidamente marcados por paciente: los tres primeros como Sepharosa 4B y los tres últimos como Con A más Sepharosa 4B. A todos los tubos se les adicionaron 100 µl de suero del paciente y 100 µl más de cada reactivo, según correspondiera. Se dejaron en el agitador de Mazzini universal, modelo OS-20, por dos horas a 150 r.p.m.



100 µl Sepharosa 4B +100 µl suero/tubo 100 µl ConA+ 100µl
Sepharosa 4B+100 µl suero/tubo

5. Se llevaron los tubos a la centrifuga refrigerada por 10 minutos a 4.000 r.p.m.
6. Se separaron 150 µl del sobrenadante en tubos de Eppendorf de 1,5 ml Gentech debidamente marcados. Posteriormente, se hizo el inmunoanálisis quimioluminiscente de partículas para determinar la ferritina. El estuche utilizado fue el 7K59 ARCHITECT.



Los valores obtenidos se utilizaron en la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de ferritina glucosilada (% FG).

$$\%FG = \frac{[FT] - \text{Nivel de FNG}}{FT} \times 100$$

La ferritina glucosilada se determinó incubando el suero con Con A-sefarosa y luego se mezcla durante dos horas a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 15 minutos para remover la ferritina glucosilada del total. La ferritina no glucosilada no se unió a la Con A y se recuperó en el sobrenadante para ser cuantificada nuevamente por inmunoensayo. De forma similar, el suero se incubó con sefarosa 4B y la ferritina medida en el sobrenadante correspondió a la ferritina sérica total. La ferritina glucosilada corresponde a la diferencia entre la ferritina total y la ferritina no ligada, y se expresa en términos de porcentaje de la ferritina total.

Técnica basada en: Worwood M, Cragg SJ, Wagstaff M, Jacobs A. Binding of human serum ferritin to concanavalin A. Clin Sci. 1979;56:83–7.